

アフリカツメガエルを用いたアミノ酸トランスポーター LAT1の 初期発生における機能解析

堅田 智久

杏林大学医学部薬理学

LAT1 (slc7a5) は中性アミノ酸の輸送に関与する Na⁺ 非依存性のトランスポーターである。この分子は 4F2hc (CD98) とダイマーを形成することによって機能を獲得し、ロイシンをはじめとするアミノ酸の輸送を担う。LAT1 の転写産物は正常組織では脳や脾臓、精巣に発現が認められ、腫瘍細胞においては特に高発現することが知られている。一方で、マウスの胎盤に発現することが明らかにされており、このことは LAT1 が胎児の発生に何らかの役割を持っていることが示唆されているが、その機能は分かっていない。

我々は、LAT1 の発生期における機能を明らかにするために LAT1 ノックアウトマウスを作出し、その表現型を解析したところ、10.5 日胚において眼の欠損が見られ、12.5 日で胚性致死となった。そこで、より解析が容易で発生研究に適したモデル動物であるアフリカツメガエルを用いて解析を続けることにした。

アフリカツメガエル LAT1 (XLAT1) は、偽四倍体のゲノム構造に由来すると考えられる XLAT1a 及び XLAT1b の 2 種類が存在することが分かった。両遺伝子間の相同性は核酸レベルで 94.0%、アミノ酸レベルで 95.5% であった。両遺伝子の特異的に認識するプライマーを用いて、RT-PCR による発生ステージ別の発現解析を行ったところ、XLAT1a は原腸胚期から発現が増加し始めるのに対し、XLAT1b は未受精卵にすでに発現していることが分かった。また、成体における臓器別の RT-PCR による解析では、XLAT1a、XLAT1b とも、脳、眼、脾臓、精巣に発現が見られ、マウスと同様の結果が得られた。whole-mount *in situ* hybridization による解析では、XLAT1a と XLAT1b を区別して検出することができなかったが、両遺伝子は、神経胚後期から眼に局在が見られ、脳及び脊索にも強く発現していることが分かった。

次に morpholino antisense oligonucleotide (MO) を用いて、機能阻害実験を行った。用いた MO は XLAT1a 及び XLAT1b のいずれの翻訳も阻害することを確認したのち、8 細胞期の動物極背側片側 1 割球に XLAT1 MO を 20ng 注入し、表現型を解析した。XLAT1 MO を注入した胚は、神経胚中期から後期において神経板の閉鎖が遅延した。神経板が完全に閉鎖する st. 20 においても、XLAT1 MO 注入胚は閉鎖が見られなかった。これらの胚は尾芽胚期 (st. 35) において、眼の大きさが小さくなるか、眼が欠損していた (図 1)。体が透明になり観察が容易になる幼生期において、眼の欠損はより明確に捉えることができた。このことはマウスにおける表現型と一致しており、LAT1 がアフリカツメガエルにおいても眼の発生に重要な役割を持っていることが示唆される。XLAT1 MO 注入胚におけるマーカー遺伝子の発現パターンを調べるために、whole-mount *in situ* hybridization による解析を行ったところ、全神経マーカーである *sox2* の発現は、XLAT1 MO が注入された領域において、神経板の領域が大きく広がっていることを示していた。この発現パターンの変化は、表皮マーカーである *xk81a1* の発現パターンの変化からも裏付けることができ、拡張した神経板領域を示すように、*xk81a1* の発現は減少していた。眼の形成の誘導が起こる前脳をマークする *otx2* の発現は、XLAT1 MO が注入された領域で後方にわずかにシフトしたような発現パターンが確認できた。また網膜マーカーである *pax6* は発現領域がやや左右に広がったパターンを示し、中脳における *pax6* の発現は後方へシフトしていることが分かった (図 2)。これらのことから、LAT1 は眼の原基が確立された後、眼を構成するコンパートメントの形態形成において何らかの役割を持つことが示唆される。

これらのことから、LAT1 は神経板の正常な閉鎖に重

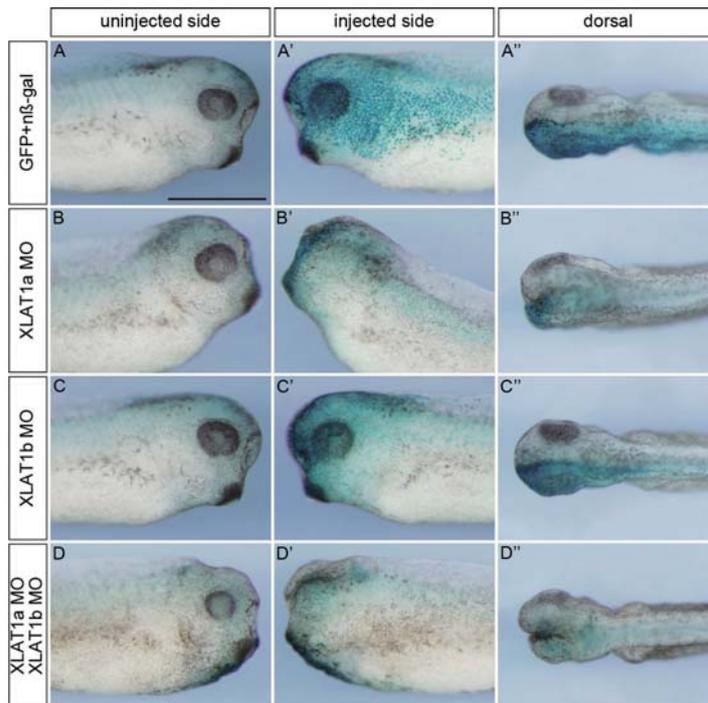


図1 LAT1の翻訳を阻害すると眼の欠損が起こる

XLAT1の機能を解析するために、8細胞期の動物極背側片側1割球にXLAT1 MOを20ng注入し、表現型を解析した。尾芽胚後期 (st. 35) で、眼の欠損が観察された。

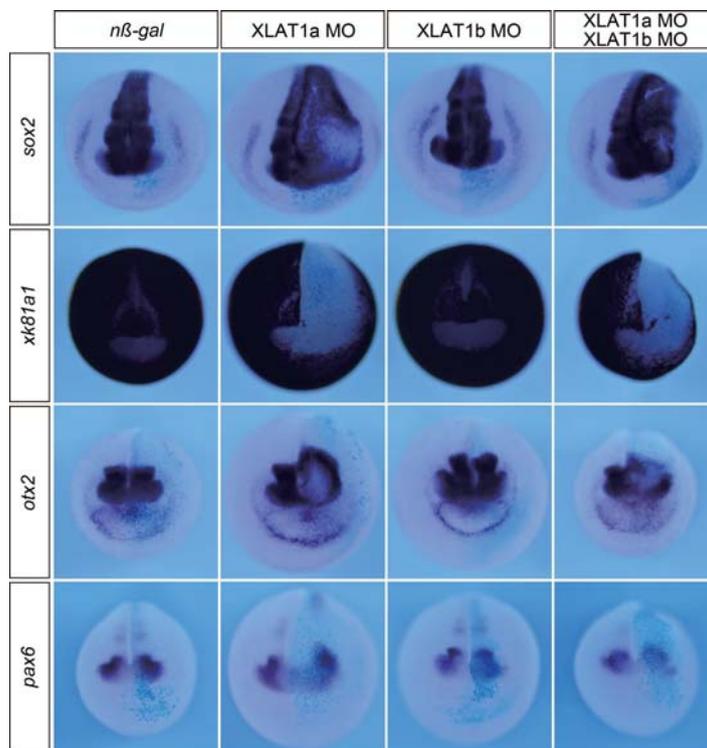


図2 XLAT1の翻訳を阻害すると神経板のパターニングが乱れる

XLAT1 MO注入胚におけるマーカー遺伝子の発現パターンを調べるために、whole-mount *in situ* hybridizationによる解析を行った。全神経マーカーである *sox2* の発現は、神経板の領域が大きく広がっていることを示していた。この発現パターンの変化は、表皮マーカーである *zk81a1* の発現パターンの変化からも裏付けることができ、*zk81a1* の発現は減少していた。前脳をマークする *otx2* の発現は、後方にわずかにシフトしたような発現パターンが確認できた。また網膜マーカーである *pax6* は発現領域がやや左右に拡がったパターンを示し、中脳における *pax6* の発現は後方へシフトしていることが分かった。

要な役割をもち、眼の形成に必須であると考えられる。

神経板の閉鎖と眼の形成に関連性があるかどうかは今のところ明らかではないが、眼の欠損が神経板の閉鎖異常に起因するのかどうかを検証する必要がある。

今後は、尾芽胚期および幼生期における眼の欠損をより詳細に解析するために、組織切片を作製してヘマトキシリン-エオシン染色による内部構造の観察を行い、眼のどの組織に最も影響が及んでいるかを調べる。また *XLAT1* の翻訳阻害による、より早期の表現型を解析する

ために、神経胚中期 (st. 15) における、*sox2*, *xk81a1*, *otx2*, *pax6* の発現パターンを解析し、さらに神経板と表皮の境界をマークする神経冠マーカーである *slug* の *in situ* hybridization を行う。また LAT1 の特異的阻害剤である JPH203 を用い、胚発生中にこれを作用させることによって、神経板のパターニング異常と眼の欠損が、LAT1 によるアミノ酸輸送の阻害によるものかどうかを検証し、*XLAT1* の発生期における役割を解明することを目指す。